

PCT/JP03/04649
10510497

日本特許庁 07.05.03
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 7月23日

REC'D 27 JUN 2003

出願番号

Application Number:

特願2002-213338

WIPO PCT

[ST.10/C]:

[JP2002-213338]

出願人

Applicant(s):

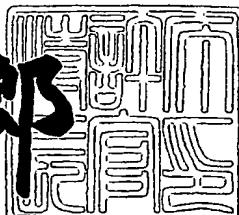
明治乳業株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 6月13日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3046234

Best Available Copy

【書類名】 特許願
【整理番号】 H14022
【提出日】 平成14年 7月23日
【あて先】 特許庁長官殿
【発明者】
【住所又は居所】 東京都東村山市栄町1-21-3
明治乳業株式会社食品開発研究所内
【氏名】 林 俊次
【発明者】
【住所又は居所】 東京都東村山市栄町1-21-3
明治乳業株式会社食品開発研究所内
【氏名】 相沢 茂
【発明者】
【住所又は居所】 東京都東村山市栄町1-21-3
明治乳業株式会社食品機能研究所内
【氏名】 竹友 直生
【発明者】
【住所又は居所】 東京都東村山市栄町1-21-3
明治乳業株式会社食品開発研究所内
【氏名】 中坪 正
【発明者】
【住所又は居所】 東京都東村山市栄町1-21-3
明治乳業株式会社食品開発研究所内
【氏名】 松永 典明
【発明者】
【住所又は居所】 東京都東村山市栄町1-21-3
明治乳業株式会社食品機能研究所内
【氏名】 木村 勝紀

【特許出願人】

【識別番号】 000006138
【住所又は居所】 東京都江東区新砂1丁目2番10号
【氏名又は名称】 明治乳業株式会社
【代表者】 中山 悠

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2002-111083
【出願日】 平成14年 4月12日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 059101
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】*Helicobacter pylori* 除菌性チーズ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 *Helicobacter pylori* 除菌能の高い*Lactobacillus gasseri*に属する乳酸菌を含有すること、を特徴とするナチュラルチーズ。

【請求項2】 *Helicobacter pylori* 除菌能が高く、低pH環境に耐性を有し、経口投与した際に生残性が高い*Lactobacillus gasseri*に属する乳酸菌を含有すること、を特徴とするナチュラルチーズ。

【請求項3】 乳酸菌が*Lactobacillus gasseri* OLL 2716株であること、を特徴とする請求項1又は2に記載のナチュラルチーズ。

【請求項4】 *Lactobacillus gasseri* が10°C以下の冷蔵下で6ヶ月以上の長期間、 10^7 cfu/g以上生残すること、を特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載のナチュラルチーズ。

【請求項5】 請求項1～4のいずれか1項に記載のナチュラルチーズを含有すること、を特徴とする食品。

【請求項6】 請求項1～4のいずれか1項に記載の*Helicobacter pylori* 除菌能の高い*Lactobacillus gasseri*に属する乳酸菌を含有するナチュラルチーズの製造において、カード形成前の任意の工程で酵母エキスを添加すること、及び／又は型詰・圧搾後のカードを保温すること、を特徴とするナチュラルチーズの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*:以下、*H. pylori* ということもある) の除菌及び／又は感染防御効果を有するラクトバチルス・ガッセリ (*Lactobacillus gasseri*:以下*L. gasseri* ということもある) を含有するナチュラルチーズ、特に、6ヶ月以上の長期間冷蔵で保存した場合にも高濃度の*L. gasseri*生残菌数を維持するナチュラルチーズに関する。

【0002】

【従来の技術】

1983年にWarrenら (Lancet, I.1273(1983)) によって胃内に棲息する細菌として *H. pylori* が発見されて以来、 *H. pylori* と慢性胃炎、 胃潰瘍および十二指腸潰瘍との関係につき注目されるようになった。最近では、スナネズミに *H. pylori* を感染させると発ガン物質の投与なしで胃腺ガンが発生する事実が認められており (Watanabe et al., Gastroenterology, 115;642(1988))、 胃ガンの起因菌としても *H. pylori* との関連が指摘されている他、 *H. pylori* 陽性の消化性潰瘍患者に対して *H. pylori* の除菌を行うと消化性潰瘍の再発が抑制されることが明らかになりつつあることから、 胃内の *H. pylori* 除菌法について種々検討がなされている。

【0003】

本発明出願人も、 抗生物質に代わる新たな胃内 *H. pylori* の除菌を目的に、 *H. pylori* 除菌能の高い *Lactobacillus gasseri* OLL 2716株 (本菌株は、 産業技術総合研究所特許生物寄託センターに FERM BP-6999 として寄託されている。以下 LG21 ともいう) を用いる方法について報告している (特開2001-143)。この発明における *Lactobacillus gasseri* OLL 2716株は、 ヒト腸内由来の数多くの乳酸桿菌のうち、 ①胃酸耐性が高い、 ②低 pH 条件下で生育が良好である、 ③*H. pylori* のヒト胃癌細胞MKN45付着抑制能が高い、 ④*H. pylori* と混合培養した際に *H. pylori* 増殖阻害能が高い、 ⑤*H. pylori* 感染モデルマウスに投与した際に *H. pylori* の除菌能が高い、 ⑥食品に適用した際に生残性が高く、 香味、 物性も優れている菌株の選定につき研究を重ねた結果、 これらの条件に合致する菌株として見出された。特に、 発酵乳を調製した際の製造特性 (保存性、 風味、 物性) に優れていることから、 発酵乳の形態で投与することが望ましく、 このように、 乳酸菌の有する抗菌力をを利用して *H. pylori* の除菌を行うことは、 副作用を伴わず手軽で有効な手段といえるが、 発酵乳という食品の性質上、 品質保持期限は2週間前後と比較的短く、 又2週間保存後の菌数は保存前の約半分に減少し、 長期間の保存にあまり適しているとはいえない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、本発明が解決しようとする課題は、*H. pylori*の除菌／感染防御能の高い*L. gasseri*を長期間保存中も高い菌数で生残させ、且つ、違和感なく通常の食生活で摂取することが可能な食品を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために銳意研究を重ねた結果、*H. pylori*の除菌／感染防御能のある*L. gasseri* OLL 2716株生菌をナチュラルチーズの形態で保持するという新規な構成をはじめて採用することで、チーズ中で*L. gasseri*が十分量生育し、長期間にわたって高濃度に生残することを見出した。しかも、通常用いるチーズの製造工程に、酵母エキスを添加する工程、型詰・圧搾後にチーズカードを保温する工程を加えることで、意外にも、チーズ中の*L. gasseri*がチーズ用乳酸菌より優位に生育し、生残するという新規有用知見を初めて発見した。本発明はかかる知見に基づいて完成されたものである。

【0006】

即ち、本発明は、

- (1) *Helicobacter pylori* 除菌能の高い*Lactobacillus gasseri*に属する乳酸菌を含有すること、を特徴とするナチュラルチーズ、
- (2) *Helicobacter pylori* 除菌能が高く、低pH環境に耐性を有し、経口投与した際に生残性が高い*Lactobacillus gasseri*に属する乳酸菌を含有すること、を特徴とするナチュラルチーズ、
- (3) 乳酸菌が*Lactobacillus gasseri* OLL 2716株であること、を特徴とする
 - (1) 又は (2) のナチュラルチーズ、
 - (4) *Lactobacillus gasseri* が10°C以下の冷蔵下で6ヶ月以上の長期間、 10^7 cfu/g以上生残すること、を特徴とする (1) ~ (3) のいずれかのナチュラルチーズ、
 - (5) (1) ~ (4) のいずれかのナチュラルチーズを含有すること、を特徴とする食品、
 - (6) (1) ~ (4) のいずれかの*Helicobacter pylori* 除菌能の高い*Lactobacillus gasseri*に属する乳酸菌を含有するナチュラルチーズの製造において、力

ード形成前の任意の工程で酵母エキスを添加すること、及び／又は型詰・圧搾後のカードを保温すること、を特徴とするナチュラルチーズの製造法、からなる。

【0007】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳述する。

【0008】

本発明におけるナチュラルチーズは、チェダーチーズ、ゴーダチーズ、エダムチーズ、ストリングチーズ、モザレラチーズ等固形状のハードタイプもしくはセミハードタイプのナチュラルチーズが好適である。

【0009】

一般に、ナチュラルチーズの製造には、原乳の標準化、殺菌等の前処理、カードの製造、これに引き続く仕上げ作業と、すべてのタイプのチーズに共通する工程がある。チーズの種類によって、スターターの種類や発酵条件、カードの処理や加塩・貯蔵法など異なる場合もあるが、本発明のナチュラルチーズにおいては、チーズ用乳酸菌スターターに、*L. gasseri*スターターを併用すること、さらには各種のチーズに適した通常の工程に加え、必要に応じて、カード製造前に酵母エキスを添加し、型詰・圧搾後のチーズカードを保温する工程を含むことを特徴とする。

【0010】

上記スターターに使われる*L. gasseri*は、*H. pylori*除菌効果を有する*L. gasseri*に属する乳酸菌であり、中でも最も望ましいのは*L. gasseri* OLL 2716株である。

【0011】

L. gasseri OLL 2716株は、ストックカルチャーからマザースターター、バルクスターターと複数の段階を経て順次に調製する方法と、マザースターターの調製工程を経ずに直接バルクスターター用もしくは製品製造用に接種する高菌数の濃縮スターター(凍結品又は凍結乾燥品)の利用が可能である。

【0012】

*L. gasseri*スターターの原乳への添加量は、用途(予防、保健、又は治療)と製造条件に応じて適宜定めることができる。*H. pylori*除菌を目的とする場合には、1日あたりのナチュラルチーズの摂取量で、最終的に 10^9 colony forming unit(以下cfuという)($9.01 \log$ cfu)程度の生菌を摂取することが望ましいので、1日の1人あたりのナチュラルチーズ摂取量に対し、これに相当する生菌数が含有するよう、*L. gasseri*スターターの原乳への添加量を決めればよい。

【0013】

以下、チeddarチーズを例に、本発明のナチュラルチーズの製造法について具体的に説明する。

【0014】

代表的なチeddarチーズの製造法として、次の方法が知られている。①原乳を標準化し、殺菌後、冷却する②乳酸菌スターターを添加し、混合する③塩化カルシウム、レンネットを添加し、乳を凝固させ、カードを形成させる④得られたカードをカッティング・クッキングしホエイを排除する⑤チeddarリング・ミリングし乾塩を添加し攪拌する⑥カードを成型し真空包装し熟成する。

【0015】

本発明に係わるナチュラルチーズを、上記方法に基づいて実施した場合の一例をあげると、①原乳40lを63°C 30分殺菌後、32°Cまで冷却した後②チーズ用乳酸菌スターター (*Lactobacillus lactis* subsp.*lactis*)、*L. gasseri*スターターを各々400ml添加し混合し③塩化カルシウム4g、レンネット0.1gを添加後45分静置し④得られたカードを幅約8mmにカッティングし20分攪拌後、40分で40°Cまで昇温し60分攪拌後、5分沈降させ、15分間ホエイを排除し⑤2時間チeddarリングした後、親指大にミリングし80g加塩する⑥2kgサイズ2個に型詰し2時間圧搾し真空包装し熟成する。その際、カード形成前に酵母エキスを添加し、⑥の型詰・圧搾後にカードを保温することが特に好ましい。

【0016】

以下、本発明の一例として、上記チーズ用乳酸菌と*L. gasseri*のバルクスターの調製法を記載する。まず、チーズ用乳酸菌のいずれかの菌株及び*L. gasseri*の保存菌をそれぞれ酵母エキス入り10%脱脂粉乳培地で3代賦活培養する。そ

の後、チーズ用乳酸菌スターは10%脱脂粉乳培地に1%接種し、*L. gasseri*スターは0.1%酵母エキス入り脱脂粉乳培地に1%接種し、前者は25°C 16時間、後者は35°C 24時間培養することで、それぞれのバルクスターが調製できる。

【0017】

また、チーズ中の*L. gasseri*をチーズ用乳酸菌より優位に生育させるには、カード形成前に、予め酵母エキスを添加しておくことが重要である。酵母エキスの添加量は、0.05~0.2%、望ましくは0.08~0.15%である。

【0018】

さらに、型詰・圧搾後のカードを保温することで、ナチュラルチーズ中の*L. gasseri*の生残性を高めることができる。温度は35~20°Cで16~26時間、望ましくは、28~22°Cで19~24時間である。

【0019】

チーズの製造にあたって、チーズの食塩含量もチーズ中の*L. gasseri*の生残性に影響を与える。*L. gasseri*の生残性は食塩濃度が高いと制限されるため、食塩含量は3%以下、望ましくは2%以下が適当である。

【0020】

同様に、*L. gasseri*の生残性は酸素の存在で制限されるため、チーズを熟成、保存するにあたっては真空包装、又は不活性ガス置換包装、もしくはワックス等で表面をシールすることが望ましい。

【0021】

こうして得られる製品は、チーズ中に*L. gasseri*が十分量成育し、且つ、熟成や保存後も*L. gasseri*が高濃度に生残するため、本発明により、*H. pylori*除菌性効果のあるチーズを安定的に得ることができる。

【0022】

【実施例】

以下、本発明を実施例、試験例を挙げてさらに詳しく説明するが、本発明はこれにより限定されるものではない。

【実施例1】*L. gasseri*入りchedarチーズの調製法

L. gasseri OLL 2716株及び市販チーズ用混合乳酸菌 (Hansen社0-180) をそれぞれ10%脱脂粉乳培地に1%ずつ接種し、*L. gasseri*は37℃で17時間、0-180は25℃で17時間培養してバルクスターを調製した。次に73℃15秒殺菌した牛乳100kgを30℃に調整し、上記*L. gasseri*および0-180バルクスターを各々1%接種し、以下常法により縦、横約30cm、高さ約10cmのchedarチーズ10kgを製造した。このchedarチーズをエバールコート・ナイロンポリエチレンフィルム(三菱樹脂社製)で真空包装して5℃、および10℃で保存した。各工程における*L. gasseri*菌数とその他の菌数、及び製造翌日から1ヶ月ごとの6ヶ月間における菌数を下記細菌検査法に基づいて測定した(表1、表2)(以下、実施する細菌検査は、何れも同様の方法で行った)。なお、chedarチーズの菌数測定部位は必要に応じ、中心部と表面部(表面から5mmまでの厚さの部分)とした。

【0023】

その結果、*L. gasseri*は最大 5×10^8 cfu/g(8.71log cfu/g)まで増加し、5℃保存では3ヶ月まで、10℃保存では1ヶ月まで 10^8 cfu/g(8.01log cfu/g)以上の菌数を維持した。6ヶ月保存後でも5℃保存、10℃保存いずれも 10^7 cfu/g(7.01log cfu/g)以上の菌数が生残していた(表2、図1)。即ち、1回のチーズ摂取量を10g程度とし、10gを1包装単位(1個)とすれば、製造後3ヶ月経過時の最大菌数は 2×10^9 cfu/個(9.31log cfu/個)、6ヶ月経過後は、最大 4×10^8 cfu/個(8.61log cfu/個)であることから、10g程度のチーズを摂取するだけでも、*H. pylori*除菌及び/又は感染防御を目的とした場合に十分な菌数を維持するチーズが得られることが確認された。chedarチーズの成分は水分42%、脂肪28%、たんぱく質26%、食塩0.9%で、チーズの風味は食塩が少なかったため塩味が少なく、酸味があり、熟成後はわずかな苦みがあったが、特に大きな問題ではなかった(表3)。

【0024】

[細菌検査方法]

- ・培地：BL寒天培地(栄研化学)6gを水100mlに溶解し、オートクレーブにて121℃15分滅菌後、約50℃に冷却し、これに馬脱纖維血液(日本バイオテスト)を5%濃度になるよう無菌的に添加し、混合後シャーレに分注して平板を作成し、菌数測定に使用した。

・希釈方法：チーズ試料は10倍量の2%第2リン酸ナトリウム溶液でカードを溶解した後生理食塩水で希釈し、チーズ以外の試料は直接生理食塩水で希釈して必要な濃度とし、上記の馬脱纖維血液入りBL平板培地に0.1ml塗布して、35℃3日間好気条件下で培養してL. gasseri生菌数およびその他の菌数を測定した。

・計測：

(1) L. gasseri：正円～やや不規則形、茶褐色、ラフ型の大型コロニーをL. gasseriとして分別計測した。

(2) その他の菌：その他の菌は概ねやや隆起した褐色、スムース型の小型コロニーであった。その他の菌はL. gasseri以外の菌数の合計で表示した。

【0025】

【表1】

Lactobacillus gasseri OLL2716株入りチエダーチーズの製造工程における菌数変化		
工程	L. gasseri菌数(log cfu/g)	その他菌菌数(log cfu/g)
殺菌乳	- (注1)	3.40
L.gasseriスター	8.00	-
O-180スター	-	8.00
仕込み乳	6.00	6.30
ホエイ	6.00	6.30
当日無塩カード	8.71	9.23
当日有塩カード	8.79	9.28
翌日	8.74	9.27

注1) 測定しなかったことを意味する(以下同じ)

【0026】

【表2】

Lactobacillus gasseri OLL2716株入りchedarチーズの保存中の菌数変化

保存温度	10°C保存 菌数(log cfu/g)				5°C保存 菌数(log cfu/g)	
	サンプル部位		表面部		中心部	
保存期間	L. gasseri	その他菌	L. gasseri	その他菌	L. gasseri	その他菌
製造直後	8.79	9.28	8.79	9.27	-	-
翌日	8.74	9.27	8.71	9.27	-	-
1週間後	8.69	9.46	8.60	9.44	-	-
2週間後	8.72	9.68	8.60	9.66	-	-
1ヶ月後	8.30	9.11	8.60	9.43	8.54	9.42
2ヶ月後	7.48	8.41	-	-	8.60	9.26
3ヶ月後	8.00	8.26	-	-	8.30	9.00
4ヶ月後	7.70	7.85	-	-	7.95	8.49
5ヶ月後	7.85	8.32	-	-	7.85	8.32
6ヶ月後	7.58	7.86	-	-	7.61	8.05

【0027】

【表3】

Lactobacillus gasseri OLL 2716株入りchedarチーズの成分・風味

項目	翌日	1ヶ月後	6ヶ月後
pH	5.10	5.12	5.23
水分(%)	-	41.82	-
食塩(%)	-	0.90	-
風味	-	やや酸味	僅か苦味

【0028】

[実施例2] L. gasseri入りゴーダチーズの調製法1

L. gasseri OLL 2716株及び市販チーズ用混合乳酸菌(Hansen社CHN-01)をそれぞれ10%脱脂粉乳培地に1%ずつ接種し、L. gasseriは37°Cで、CHN-01は25°Cでそれぞれ17時間培養してバルクスターターを調製した。次に73°C15秒殺菌した部分脱脂乳(SNF8.5%、FAT3%)100kgを32°Cに調整し、L. gasseriおよびCHN-01バルクスターターを各々1%接種し、以下常法により縦、横約30cm、高さ約10cmのゴーダチーズ10kgを製造した。各工程における菌数量は表4の通りであり、得られたゴーダチーズの成分は水分43%、脂肪24%、たんぱく質25%、食塩1.7%であった。このゴーダチーズをエバールコート・ナイロンポリエチレンフィルムで真空包装して5°C、および10°Cで保存し、包装翌日から1ヶ月ごとに6ヶ月間L. ga

*sseri*菌数とその他の菌数を測定したところ、ゴーダチーズの場合も*L. gasseri*は最大 6×10^8 cfu/g(8.8log cfu/g)まで増加し、10°C保存の中心部では3ヶ月目まで、5°C保存の中心部では6ヶ月目まで 10^8 cfu/g(8.0log cfu/g)以上の菌数を維持した。10°C、6ヶ月保存後でも中心部は 10^7 cfu/g(7.0log cfu/g)以上の菌数を維持した。表面部(表面から厚さ5mmまで)では菌数が減少するのが早く、1ヶ月で 10^7 cfu/g(7.0log cfu/g)に低下し、6ヶ月後には 10^6 cfu/g以下(6.0log cfu/g)となつた(表5、図2)。ゴーダチーズとしての風味は特に問題なかった(表6)。

【0029】

【表4】

Lactobacillus gasseri OLL2716株入りゴーダチーズの製造工程における菌数変化

工程	<i>L. gasseri</i> 菌数(log cfu/g)	その他菌菌数(log cfu/g)
殺菌乳	-	3.48
<i>L. gasseri</i> スター	9.03	-
CHN-01スター	-	9.03
仕込み乳	6.79	6.92
ホエイ	6.08	6.04
当日無塩カット	8.74	9.23
翌日有塩カット	8.75	9.69

【0030】

【表5】

Lactobacillus gasseri OLL2716株入りゴーダチーズの保存中の菌数変化

保存温度	10°C保存 菌数(log cfu/g)				5°C保存 菌数(log cfu/g)			
	サンプル部位		表面部		サンプル部位		表面部	
	保存期間	<i>L. gasseri</i>	その他菌	<i>L. gasseri</i>	その他菌	<i>L. gasseri</i>	その他菌	<i>L. gasseri</i>
製造直後	8.75	9.69	8.74	9.67	-	-	-	-
1週間後	8.78	9.74	8.60	9.66	-	-	-	-
2週間後	8.81	9.77	8.38	8.76	-	-	-	-
1ヶ月後	8.60	9.04	7.78	8.73	8.78	9.62	7.78	8.73
2ヶ月後	8.00	8.60	7.10	8.42	8.60	9.20	7.48	8.70
3ヶ月後	8.08	7.41	-	-	8.38	8.75	-	-
4ヶ月後	7.60	7.04	-	-	8.04	8.86	-	-
5ヶ月後	7.38	7.36	-	-	8.04	7.79	-	-
6ヶ月後	7.67	6.20	<6.00	<6.00	8.01	7.30	<6.00	<6.00

【0031】

【表6】

Lactobacillus gasseri OLL 2716株入りゴーダチーズの成分・風味			
項目	翌日	1カ月後	6カ月後
pH	5.18	5.29	5.23
水分(%)	-	43.36	-
食塩(%)	-	1.70	-
風味	-	やや酸味	やや酸味

【0032】

【実施例3】 *L. gasseri*が増強されたゴーダチーズの調製法2

L. gasseri OLL 2716株を0.1%酵母エキス(Difco)入り10%脱脂粉乳培地に、市販チーズ用乳酸菌*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*(Hansen社CH-01)を10%脱脂粉乳培地にそれぞれ1%になるよう接種し、*L. gasseri*は37°Cで24時間、*L. lactis*は25°Cで17時間培養してそれぞれバルクスターターを調製した。次に73°C15秒殺菌した部分脱脂乳(SNF8.5%、FAT3%)20kgを32°Cに調整し、*L. gasseri*および*L. lactis*バルクスターターを各々1%接種し、さらに酵母エキス20gを添加した。以下常法によりチーズカードを製造し、プレス後、型枠に入れたまま室温25°Cの部屋で24時間保温後、型枠からチーズを取り出して10°Cの20%食塩水に24時間浸漬し、直径約20cm、高さ約8cmの車輪状のゴーダチーズ2kgを製造した。各工程における*L. gasseri*菌数とその他の菌数は表7の通りである。このゴーダチーズをエバールコート・ナイロンポリエチレンフィルムで真空包装して5°C、および10°Cで保存し、包装翌日から1ヶ月ごとに6ヶ月間*L. gasseri*菌数とその他の菌数を測定した。

【0033】

その結果、*L. gasseri*は製造日から著しく増殖し、*L. gasseri*入りチーズの中心部では6ヶ月間 10^8 cfu/g(8.01og cfu/g)以上の菌数が維持されることが確認された(表8、図3)。また、製造日当日では、*L. gasseri*、その他の菌ともにほぼ同じ菌数であったが、翌日から*L. gasseri*のみ増殖し、製造後3ヶ月経過後も、他の菌と比較して*L. gasseri*の菌数が高く維持されていることがわかった。即ち、実施例2のゴーダチーズの製造工程に、カード製造前に酵母エキスを添加しプレス後得られたカードを保温することで、*L. gasseri*の生育が増強されるこ

とが確認された。得られたゴーダチーズの成分は水分40%、脂肪26%、たんぱく質26%、食塩1.5%であった。風味については、特に問題なかった(表9)。

【0034】

【表7】

Lactobacillus gasseri OLL2716株増菌ゴーダチーズの製造工程における菌数変化

工程	L. gasseri菌数(log cfu/g)	その他菌菌数(log cfu/g)
殺菌乳	-	3.26
L. gasseriスター	8.95	-
L. lactisスター	-	8.60
仕込み乳	6.30	7.40
ホエイ	8.76	8.97
当日無塩カット	8.90	8.90
翌日有塩カット	9.08	9.08

【0035】

【表8】

Lactobacillus gasseri OLL2716株増菌ゴーダチーズの保存中の菌数変化

保存温度	10°C 保存 菌数(log cfu/g)				5°C 保存 菌数(log cfu/g)			
	サンプル部位		中心部	表面部	中心部	表面部	中心部	表面部
	L. gasseri	その他菌	L. gasseri	その他菌	L. gasseri	その他菌	L. gasseri	その他菌
製造直後	9.08	9.08	9.08	9.06	-	-	-	-
1週間後	9.08	8.85	9.15	8.66	-	-	-	-
2週間後	9.26	8.00	9.11	8.66	9.59	8.95	-	-
1ヶ月後	9.49	8.48	9.18	8.70	9.53	8.90	9.53	8.90
2ヶ月後	9.00	8.00	8.90	8.30	9.30	8.30	9.30	8.23
3ヶ月後	9.06	7.00	8.87	8.87	9.23	8.30	8.08	7.00
4ヶ月後	8.93	7.48	6.30	8.91	9.11	7.70	6.48	5.00
5ヶ月後	8.74	6.00	6.26	8.30	9.18	6.00	6.11	-
6ヶ月後	8.58	-	6.18	-	9.11	-	6.08	-

【0036】

【表9】

Lactobacillus gasseri OLL 2716株増菌ゴーダチーズの成分・風味

項目	翌日	1ヶ月後	3ヶ月後	6ヶ月後
pH	5.37	5.02	5.18	5.25
水分(%)	-	40.02	-	-
食塩(%)	-	1.51	-	-
風味	-	良	良	良

【0037】

[実施例4] *L. gasseri*入りストリングチーズの調製法

実施例3で得た食塩水浸漬前のチーズカード2kgを、製造翌日に1辺2cmの立方体に刻み、金属製の目の細かい網籠に入れ、60°Cの湯水10kgに5分間浸漬した。チーズを湯水から取り出し、手でもみ込んでカードを結着させ、円柱状に整形した後、左右に引っ張り、直径3cmの円柱状のカードを得た。これを直ちに2°Cの20%食塩水に1時間浸漬して組織を固定し、纖維性のあるチーズ(ストリングチーズ)を製造した。この纖維性のあるチーズをエバールコート・ナイロンポリエチレンフィルムで真空包装し、包装の翌日から1ヶ月ごとに3ヶ月間*L. gasseri*菌数とその他の菌数を測定した。*L. gasseri*は製造翌日から3ヶ月間 10^8 cfu/g(8.01og cfu/g)以上の菌数を維持することが確認された(図4)。風味、纖維性共に良好であった(表10)。

【0038】

【表10】

Lactobacillus gasseri OLL 2716 株入りストリングチーズの成分・風味

項目	製造翌日	1ヶ月後	3ヶ月後
pH	5.23	5.28	5.35
水分(%)	-	43.32	-
食塩(%)	-	1.3	-
風味	淡白	良好	良好
纖維性	強い	強い	あり

【0039】

[実施例5] *L. gasseri*入りチーズの抗*H. pylori*効果

実施例4で調製し、エバールコート・ナイロンポリエチレンフィルムで真空包装後、5°Cで5ヶ月保存した*L. gasseri*入りチーズ5gに生理食塩水45gを添加して、ストマッカーでよく混合した。当該混合液5mlをpH 6に調整した*Brucella broth* 50ml, FCS 2.5mlおよび別途培養した*H. pylori*培養液5mlを添加し、37°Cで微好気条件下で培養した。対照として、*L. gasseri*を添加せずに作製し、同様に保管したストリングチーズを用いた実験も行った。培養開始0, 24, 48時間後の*H. pylori*および*L. gasseri*の菌数を測定した。その結果、*L. gasseri*入りチーズを添加して培養した場合、48時間後には*H. pylori*は検出限界以下に減少した(

図5)。

【0040】

[試験例1] *L. gasseri*の耐塩性試験

試験管に食塩濃度2~10%になるように調製した10%脱脂粉乳培地(オートクレーブ後に食塩と混合)を入れ、*L. gasseri* OLL 2716株を 2×10^7 cfu/gになるよう植菌し、35°C 24時間静置培養後翌日の菌数を測定した。食塩2%では問題なく増殖し、3~4%では僅かに増殖する。5%ではほぼ静菌状態であり、6%以上で菌数が減少した。これをチーズ中の食塩/水分(S/M)で換算するとチーズの塩分0.5%では問題なく増殖、1%ではやや増殖、1.25%では静菌、1.5%以上では減少ということになる。したがって、ブライン加塩するゴーダチーズは食塩含量が2%を越えない範囲となるよう調整することが好ましいことが確認された(図6)。

【0041】

【発明の効果】

【0042】

本発明によれば、*Helicobacter pylori*除菌能が高く、低pH環境に耐性を有し、生残性が高い*Lactobacillus gasseri*に属する乳酸菌を高濃度に含有するナチュラルチーズを得ることができる。*L. gasseri*生菌を長期間保持できるうえ、一般的のナチュラルチーズと同様、そのまま経口投与に供すことができることから、健常者はもとより、乳幼児、老齢者、病弱者、病後の人等も長期間にわたって摂取することができ、胃炎や胃潰瘍等に特に優れた予防及び/又は治療効果を奏する。

【0043】

前述したように、チーズ製造や保存において、標準的なチーズの製造条件や保存条件をとることで、*L. gasseri*菌数を十分量維持することも可能であるが、さらに、この製造工程に、酵母エキスを添加する工程、型詰・圧搾後のチーズカードを保温する工程を加えることで、*L. gasseri*の増殖活性、生残性が一層増強され、他の乳酸菌と比較して*L. gasseri*が優位に増殖し、この菌数を長期にわたって維持することが可能となることから、少量の食品摂取量で*L. gasseri*の必要菌数を十分量摂取することができる点においても、非常に有用な発明といえる。

【0044】

【図面の簡単な説明】

【図1】 *L. gasseri*入りchedarチーズの菌数変化を示す(実施例1)。

【図2】 *L. gasseri*入りゴーダチーズの菌数変化を示す(実施例2)。

【図3】 *L. gasseri*増菌ゴーダチーズの菌数変化を示す(実施例3)。

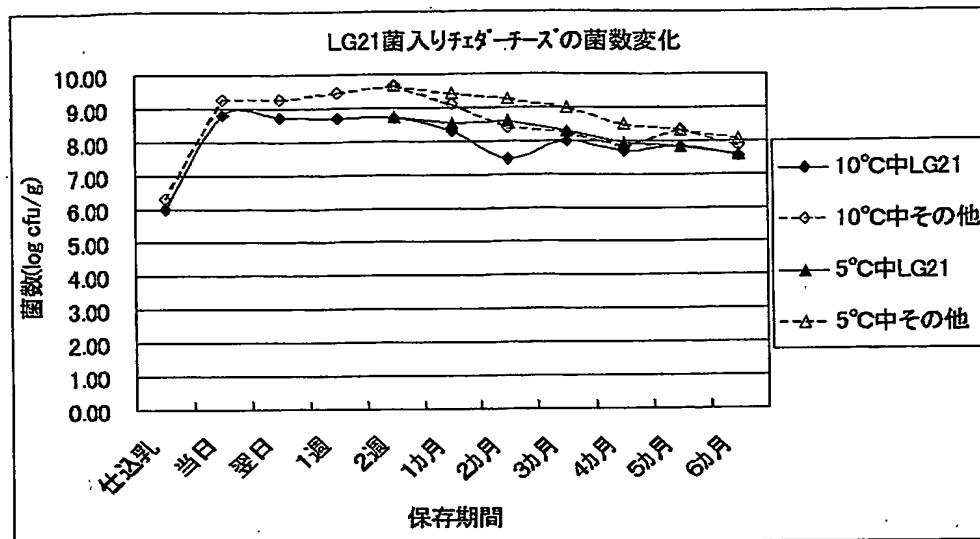
【図4】 *L. gasseri*入リストリングチーズの菌数変化を示す(実施例4)。

【図5】 *L. gasseri*入りチーズの抗*H. pylori*効果を示す(実施例5)。■及び△は、*L. gasseri*入りチーズと*H. pylori*を混合培養した際の、*H. pylori*及び*L. gasseri*の生菌数をそれぞれ示す。また◆は、*L. gasseri*非添加チーズと*H. pylori*を混合培養した際(対照)の、*H. pylori*の生菌数を示す。

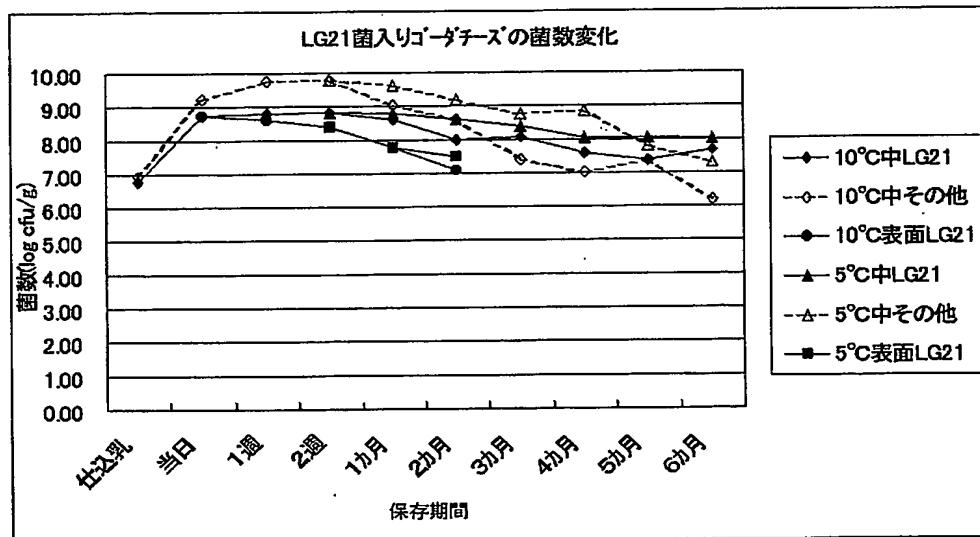
【図6】 *L. gasseri*の耐塩性を示す(試験例1)。

【書類名】 図面

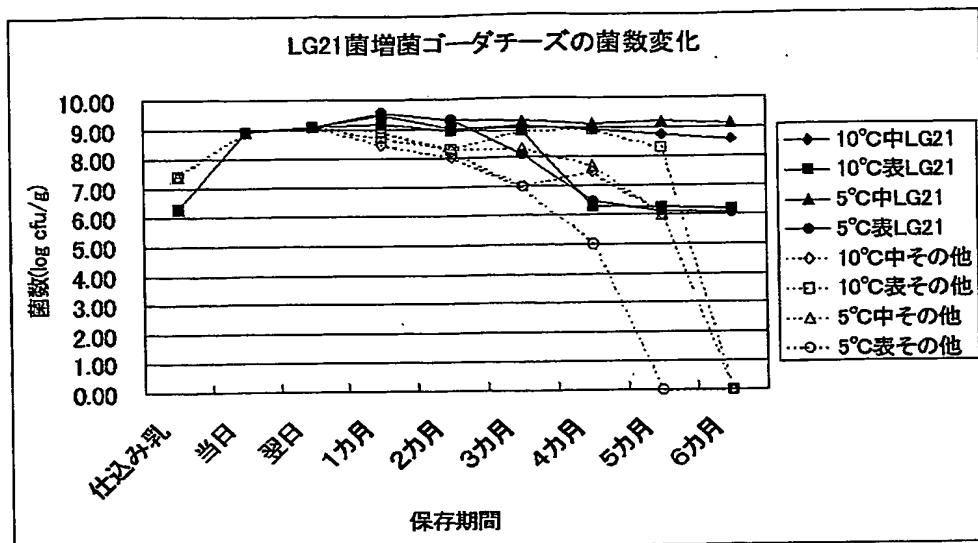
【図1】



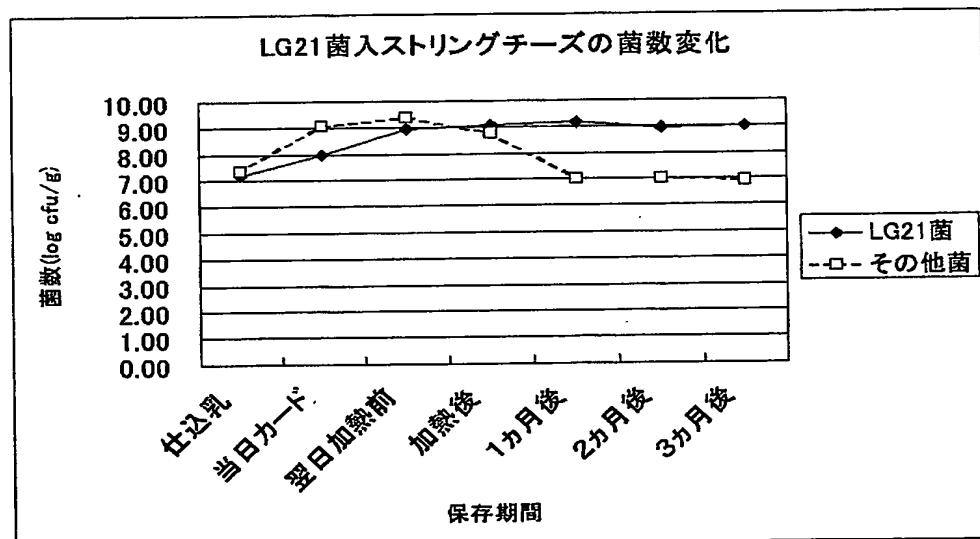
【図2】



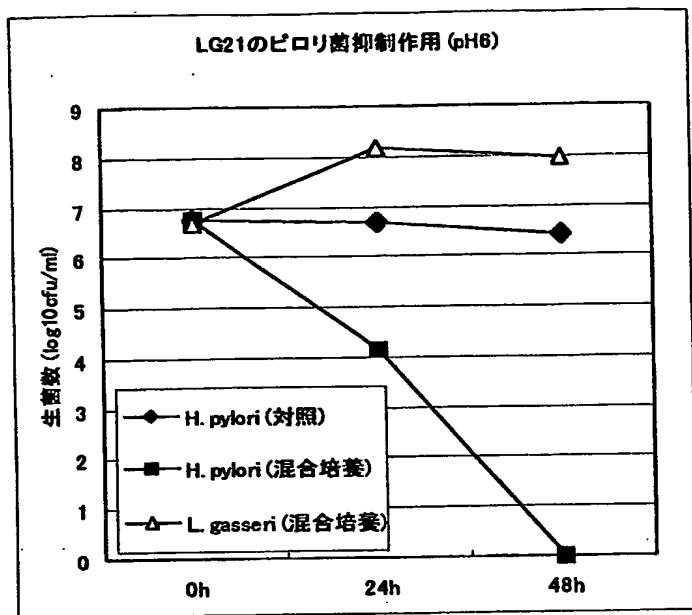
【図3】



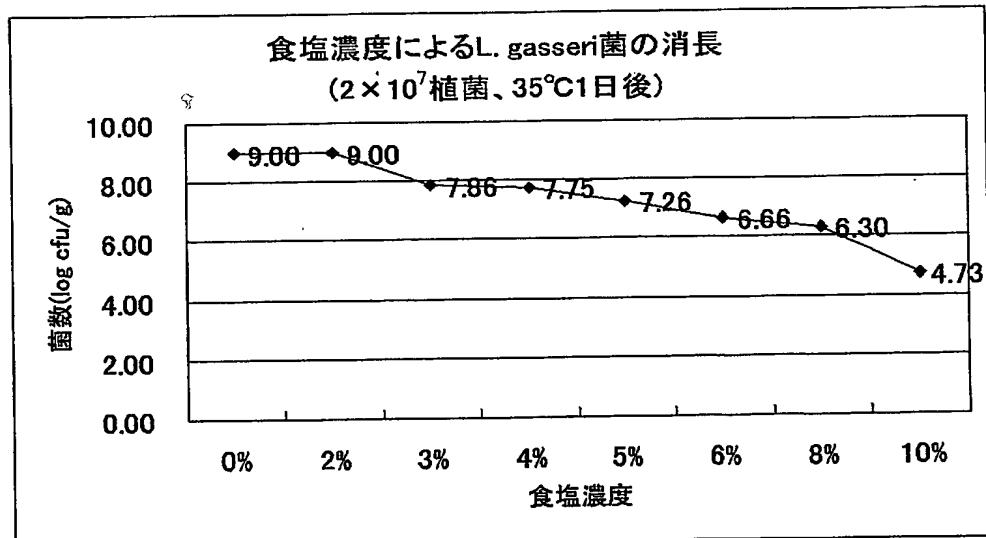
【図4】



【図5】



【図6】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】

*H. pylori*の除菌／感染防御能の高い*L. gasseri*を長期間保存中も高い生菌数を維持し、且つ、違和感なく通常の食生活で摂取することが可能な食品を提供する。

【課題を解決するための手段】

通常の乳酸菌に加え、*H. pylori*の除菌／感染防御のある*L. gasseri*を併用し、チーズの種類に適した工程に加え、カード製造前に酵母エキスを添加する工程、型詰・圧搾後のカードを保温する工程を加えることで、*L. gasseri*がチーズ用乳酸菌より優位に生育し生残するナチュラルチーズを製造することができる。

【選択図】

なし

出願人履歴情報

識別番号 [000006138]

1. 変更年月日 2001年10月 2日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都江東区新砂1丁目2番10号

氏 名 明治乳業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.